

## EET 生合成酵素の細胞増殖における役割とその機構の解析

関西学院大学大学院理工学研究科  
生命科学専攻 今岡研究室 坂元 弘一

エポキシエイコサトリエン酸 (EET) は、血管拡張作用 (EDHF) のほか、抗炎症作用や血管新生など、多彩な働きを有する重要な生理活性物質である。最近、癌の増殖にも EET が関与することが報告されたが、その機構はわかっていない。癌の増殖時には急激な細胞分裂により低酸素状態になることが知られている。そこで、EET による癌の増殖の促進には低酸素応答が関与するのではないかと考え、低酸素応答および EET 生合成酵素に着目し、EET による癌細胞増殖促進の機構を解析することを本研究の目的とした。

EET はアラキドン酸がチトクローム P450 (P450) によりエポキシ化されたもので、5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET、14,15-EET の 4 つの異性体が存在し、それぞれ働きが異なることが知られている。また、EET は soluble epoxide hydrolase (sEH) によって、ジヒドロキシエイコサトリエン酸 (DHET) に加水分解される。先行研究により、ヒト肝癌細胞株 (Hep3B) に 11,12-EET および 14,15-DHET を添加することで、低酸素応答の鍵因子である Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$  の発現量が増加し、その下流の低酸素応答因子である VEGF (血管内皮成長因子) が誘導されることが明らかとなっている。また、Hep3B において CYP2C8、CYP2C9、CYP3A4 の 3 種の P450 が EET 合成に関与することが明らかとなっている。

この EET 生合成酵素の CYP2C8 および CYP3A4、EET 合成には関与しない CYP2D6 をそれぞれ過剰発現させて低酸素応答への影響を検討した結果、CYP2C8 および CYP3A4 の過剰発現により、VEGF の上流にある低酸素応答領域 (HRE) を用いたレポーター活性、VEGF の mRNA 発現ならびに HIF-1 $\alpha$  の発現量がそれぞれ増加したのに対し、CYP2D6 の過剰発現では顕著な変化が見られなかった。このことから、EET 生合成酵素が低酸素応答に関与することが示唆された。また、同様の細胞を用いて細胞増殖への影響を検討したところ、CYP2C8 および CYP3A4 の過剰発現により細胞増殖が促進され、その促進はそれぞれの特異的な阻害剤である sulfaphenazole および ketoconazole の存在下で抑えられたが、CYP2D6 の過剰発現では顕著な変化は見られなかった。一方、P450 の電子伝達酵素である NADPH-P450 reductase (NPR) を diphenyleneiodonium chloride (DPIC) により阻害、もしくはノックダウンすることにより細胞増殖は顕著に抑制された。以上の結果から、EET 生合成酵素が細胞増殖にも関与することが示唆された。これらの現象が、EET 生合成酵素が産生した EET によるものであることを確かめるため、EET のアンタゴニストとして知られる 14,15-EEZE を添加したところ、CYP3A4 過剰発現細胞の増殖が抑えられた。また、LC/MS により、CYP3A4 過剰発現細胞で細胞内の EET 量が増加していることが確認できたことから、EET 生合成酵素過剰発現による細胞増殖促進には、やはり EET が関与していると考えられる。この機構を解明するため、EET の核内受容体の候補である PPAR $\gamma$  に着目したが、CYP3A4 過剰発現細胞を PPAR $\gamma$  のアゴニスト、アンタゴニストで処理したところ変化が見られなかったことから、PPAR $\gamma$  は EET による細胞増殖促進には関与しないと考えられる。

以上の結果から、EET 生合成酵素の過剰発現により内在性の EET 量を増やすことで HIF-1 $\alpha$  が増加し、低酸素応答が促進され、また細胞増殖も促進されることが明らかとなった。すなわち、EET が癌細胞の増殖に HIF-1 $\alpha$  を介して関わっている可能性が示唆された。将来的にこのメカニズムが明らかにされることで、EET 生合成酵素をターゲットとした新たな癌の治療法の開発が期待される。